



Hans Christian Gram
(1853-1938)

Práctica 3: **TINCIÓN DIFERENCIAL DE GRAM**

INTRODUCCIÓN:

La tinción diferencial requiere más de un tipo de colorante y se utiliza para distinguir entre varios tipos de células bacterianas. Una tinción diferencial típicamente consiste de tres pasos principales: primero un colorante primario, el cual se utiliza para teñir a todas las células en la tinción; enseguida un paso de decoloración, el cual remueve el colorante solo de ciertos tipos de células y finalmente un colorante de contraste, el cual tiñe las células recién decoloradas pero no tiene efecto sobre las células que aún retienen el colorante primario.

La tinción propuesta por el médico danés Christian Gram en 1884, es una de las tinciones diferenciales más utilizadas en bacteriología, que clasifica los cultivos bacterianos de menos de 24 horas en Gram positivas y Gram negativas. La reacción de la tinción de Gram se basa en la cantidad de peptidoglucano que se encuentra en las paredes celulares de estas bacterias. Las bacterias Gram positivas tienen muchas capas de peptidoglucano, las cuales a su vez, sostienen moléculas de ácido teicoico. El ácido teicoico reacciona con el cristal violeta y el yodo utilizado en este proceso de tinción. Un complejo de las moléculas cristal violeta-yodo-ácido teicoico es muy difícil de remover. Como la pared celular de las células Gram positivas retiene estos compuestos, es más difícil decolorar una célula Gram positiva que una Gram negativa. Una mezcla de alcohol remueve el cristal violeta de la célula Gram negativa, pero no de la Gram positiva. Esta mezcla de alcohol también disuelve mucho de la capa exterior de lipopolosacárido de la pared celular de la pared Gram negativa, lo cual acelera la remoción del colorante primario cristal violeta de estas células.

Cuando otro colorante, usualmente safranina, se añade, las células Gram positivas siguen de color azul-violeta mientras que las Gram negativas absorben el color rojizo de la safranina. Al final del procedimiento de tinción, las células Gram positivas serán del color del cristal violeta, o colorante primario, y las células Gram negativas serán del color de la safranina que es el colorante de contraste.

OBJETIVOS:

1. Clasificar algunas especies bacterianas en Gram positivas o Gram negativas de acuerdo a la tinción de Gram.
2. Comprender la importancia que tienen estas tinciones para la caracterización e identificación de las bacterias.

MATERIAL POR EQUIPO:

- Microscopio óptico ☹
- *Colorantes para tinción de Gram*
- 1 mechero ☹
- asa microbiológica
- Pizeta ☹
- *Recipiente de plástico para las tinciones*
- Aceite de inmersión ☹
- Papel seda ☹
- Plumón indeleble
- *Cultivos bacterianos*

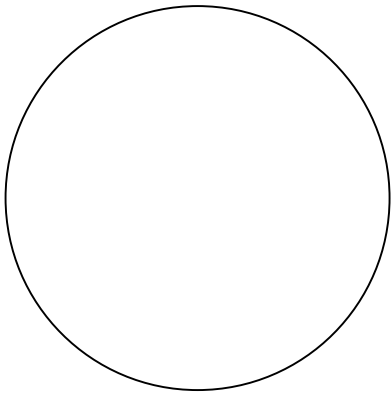
(El material en letras cursivas será proporcionado por el profesor. Pedir el material marcado con ☹)

PROCEDIMIENTO:

1. Marcar un portaobjetos con el nombre del microorganismo a observar. Cada equipo deberá hacer obligatoriamente cinco preparaciones (una preparación por persona): una de *E. coli*, una de *Bacillus sp.*, una de *Serratia marcescens*, una de *Klebsiella pneumoniae* y alguna de *Pseudomonas*.
2. Elaborar preparaciones fijas de las bacterias a observar.
3. Añadir 1 ó 2 gotas de cristal violeta a la preparación, hasta que se cubra por completo. Dejar actuar el colorante durante 1 minuto.
4. Una vez transcurrido el tiempo, lavar la preparación con la pizeta sobre el recipiente de plástico para tinciones.
5. Agregar 1 ó 2 gotas de solución lugol a la preparación, y dejar actuar 1 minuto. Transcurrido el tiempo, lava.
6. Con cuidado, añadir gota a gota el alcohol-acetona lavando la preparación durante 10 segundos.
7. Añadir el colorante de contraste, safranina (1 ó 2 gotas) y dejar actuar durante 30 segundos. Lava con la pizeta.
8. Dejar secar al aire y observar al microscopio, siguiendo la técnica de la práctica anterior para enfocar correctamente. Observar con el objetivo de inmersión.

RESULTADOS: describe brevemente los resultados obtenidos.

Dibuja tus observaciones

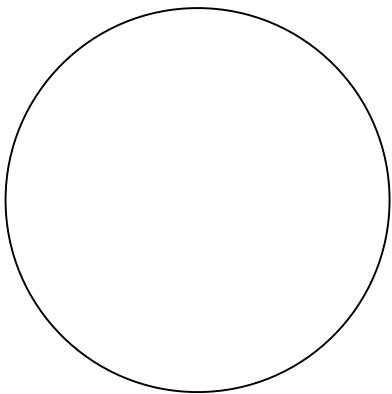


Género o especie:

Aumento: ×

Morfología:

Gram:

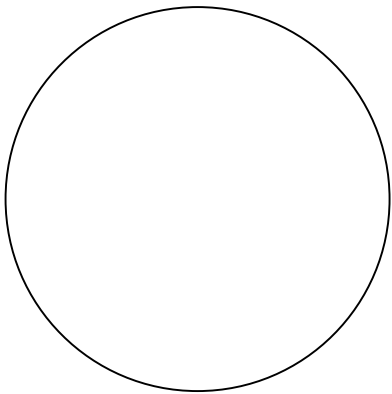


Género o especie:

Aumento: ×

Morfología:

Gram:

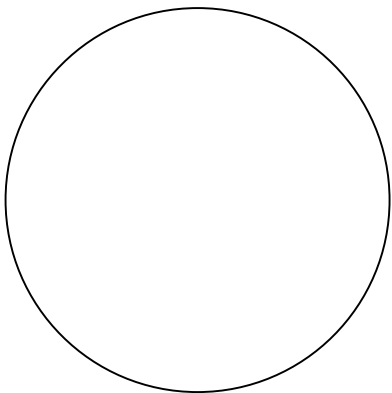


Género o especie:

Aumento: ×

Morfología:

Gram:



Género o especie:

Aumento: ×

Morfología:

Gram:

DISCUSIÓN

- Busca en la literatura, a los microorganismos observados en la práctica y compara tus resultados con lo reportado.
- Si observaste alguna diferencia en cuanto a morfología o reacción a la tinción de Gram, trata de buscar alguna explicación.
- Investiga qué tipo de variables pueden ocasionar que se obtengan resultados no deseables cuando se realiza una tinción de gram (por ejemplo que una bacteria Gram negativa se colore de morado).

BIBLIOGRAFÍA

CUESTIONARIO 3

a) **Glosario.** Define los siguientes términos.

1. Colorante
2. Mordente
3. Tinción diferencial
4. Tinción simple
5. Peptidoglucano
6. Ácido teicoico
7. Espacio periplásmico
8. Porinas
9. Membrana celular
10. Lipopolisacárido

b) Haz un diagrama de flujo sobre el proceso de la tinción de Gram, indicando la función de cada sustancia empleada.

c) Haz un dibujo de las paredes celulares de una bacteria Gram positiva y una Gram negativa señalando las principales estructuras en ellas.